

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2004年10月28日 (28.10.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/092377 A1(51)国際特許分類<sup>7</sup>:

C12N 15/10, C07K 2/00

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21)国際出願番号:

PCT/JP2004/005392

(22)国際出願日:

2004年4月15日 (15.04.2004)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:

特願2003-144152 2003年4月15日 (15.04.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社クレディアジャパン(CREDIA JAPAN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台1丁目7番地 けいはんなプラザラボ棟5階 Kyoto (JP).

(72)発明者: 外崎円(TONOSAKI,Madoka); 〒344-0054埼玉県春日部市浜川戸1丁目14番地4 Saitama (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 池田壽文(IKEDA,Hisafumi) [JP/JP]; 〒270-0115 千葉県流山市江戸川台西3丁目31番地1号エステート江戸川台8棟307号 Chiba (JP).

(74)代理人: 赤尾直人(AKAO,Naoto); 〒113-0034 東京都文京区湯島四丁目8番1号 レオ竜岡402号 Tokyo (JP).

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## 規則4.17に規定する申立て:

- USのみのための発明者である旨の申立て(規則4.17(iv))

## 添付公開書類:

- 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL FUNCTIONAL PEPTIDE NUCLEIC ACID AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54)発明の名称: 新規な機能性ペプチド核酸およびその製法

(57) Abstract: In a process for producing a functional PNA oligomer, a PNA monomer unit having protected adenine, guanine, cytosine or thymine is reacted with Boc lysine (Fmoc)-OH or Fmoc-lysine (Alloc)-OH to synthesize a PNA oligomer. Then a functional molecule having a free carboxylic acid is transferred into the above PNA oligomer and the protecting group is deblocked. According to this method having a good cost performance, a functional molecule can be transferred at an extremely high speed. Moreover, this method makes it possible to synthesize the above compound and the Boc lysine (Fmoc)-OH or Fmoc-lysine (Alloc)-OH serving as a precursor PNA monomer unit.

(57)要約: 機能性PNAオリゴマーを製造する方法において保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有するPNAモノマーアニットを、Bocリジン(Fmoc)-OH或いはFmoc-リジン(Alloc)-OHと反応させてPNAオリゴマーを合成した後、該PNAオリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子を導入し、さらに前記保護基の脱保護を行うことを含む方法によって、コストパフォーマンスに優れ、かつ機能性分子を超高速に導入することが可能となり、しかも、当該方法によって合成される化合物および前駆体的PNAモノマーアニットとして機能するBocリジン(Fmoc)-OH或いはFmoc-リジン(Alloc)-OHを製造することができる。

WO 2004/092377 A1

## 明細書

## 新規な機能性ペプチド核酸およびその製法

## 技術分野

本発明は、リジンを使用した機能性ペプチド核酸オリゴマーおよびその中間体の新規な製造方法に関する。

## 背景技術

核酸は生物の遺伝情報を司る DNA および RNA である。これに対して、ペプチド核酸 (PNA) とは、核酸の糖リン酸骨格を N-(2-アミノエチル)グリシン骨格に変換した修飾核酸である (図 1)。DNA/RNA の糖リン酸骨格は中性条件で負電荷を帯びていて相補鎖間の静電的な反発があるが、PNA の背骨構造はもともと電荷を持たないので静電的な反発がない。そのため PNA は従来の核酸と比較して、高い二重鎖形成能をもち、高い塩基配列認識能を持つ。さらに PNA は生体内ヌクレアーゼ・プロテアーゼに対し非常に安定で分解されないので、アンチセンス分子として遺伝子治療に応用することが検討されている。

従来の DNA を媒体にしていた技術を PNA 化することにより、これまで克服できなかつた DNA の欠点を補うことが可能となった。例えば、遺伝情報の体系的な解析を高速に且つ大量に行うための「DNA マイクロアレイ技術」および塩基配列を特異的に認識したことを蛍光発光により検出できるプローブとして最近開発された「モレキュラービーコン」に応用することが可能である。これらはいずれも酵素耐性に乏しい DNA を媒体とするため、これらの技術を用いるに際しては厳密なサンプリングが要求される。この要求を満たすことが、前記の技術を高度化する上の鍵となっている。

一方 PNA は酵素に対し完全な耐性を持つので、DNA マイクロアレイ技術およびモレキュラービーコンにおいて PNA を DNA に代用することによって、前記技術の欠点が克服され、さらに長所が引き出されるものと期待されている。

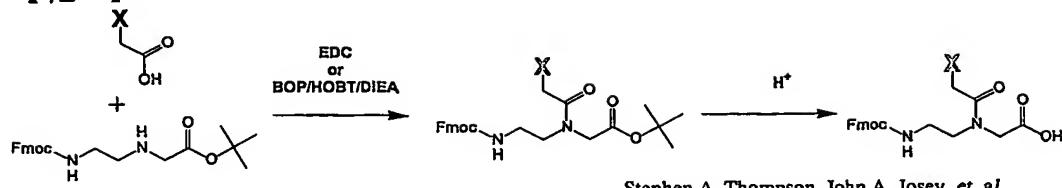
DNA マイクロアレイ技術およびモレキュラービーコン以外にも PNA 化することにより発展が期待される分野は数多いが、それらにおいては PNA の効率的な機能化、すなわち PNA モノマーへの機能性分子の効率的な導入による新規な PNA モノマーの設計が必要である。

PNA オリゴマーの合成方法には通常の固相ペプチド合成法を用いるので、PNA モノマーユニットを PNA の背骨構造によって分類すると、Fmoc 型 PNA モノマーユニットと Boc 型 PNA モノマーユニットの 2 種類が含まれる (図 2)。

Fmoc 型 PNA モノマーユニットの合成方法は既に確立されており、しかもそのオリゴマーの合成は一般的な DNA 自動合成機によって可能であるた

め、下記のルート

【化 4】



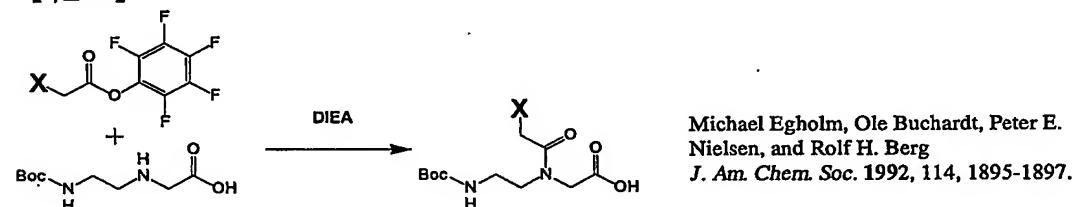
Stephen A. Thompson, John A. Josey, et. al,  
Tetrahedron 1995, 51, 6179-6194.

(X はグアニン、チミン、シトシンまたはアデニンを表す)  
によって、少量スケールでの合成が可能となっている。

なお、Fmoc とは 9-Fluorenylmethoxycarbonyl、Boc とは tButoxycarbonyl、Alloc とは Allyloxycarbonyl を指す。

当初 PNA には下記のような Boc 型 PNA モノマーユニット

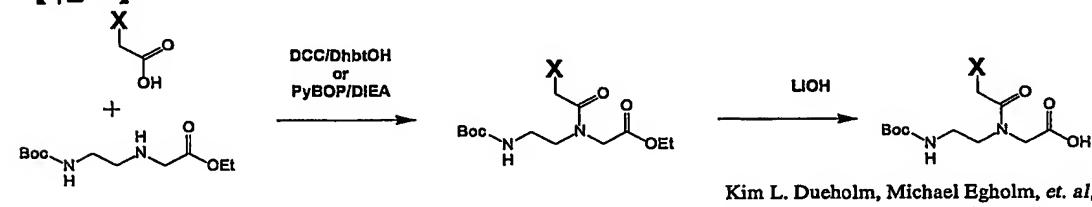
【化 5】



Michael Egholm, Ole Buchardt, Peter E.  
Nielsen, and Rolf H. Berg  
J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 1895-1897.

が採用され、その後より効率のよい合成方法

【化 6】



Kim L. Dueholm, Michael Egholm, et. al,  
J. Org. Chem. 1994, 59, 5767-5773.

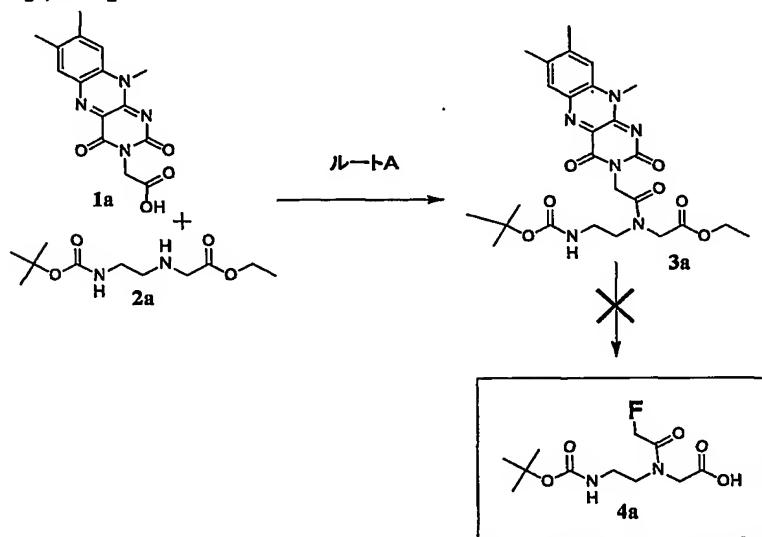
が確立された。しかし、前述したように取り扱いが容易な Fmoc 型が開発されたため、Boc 型の使用頻度は減少している。

しかし、グアニン・チミン・シトシン・アデニン 4 種類の核酸塩基以外の機能性分子を導入する際、例えば光機能性分子を導入する際には、導入する機能性分子がアルカリ条件に不安定な場合が多いので、アルカリ条件を使用しない Boc 型 PNA 背骨構造の有用性は高い。「t-ブロトキシカルボニルアミノエチルアミン及びアミノ酸誘導体の製造方法」に関しては、本発明者ら

が特願 2000-268638 として既に特許出願中である。

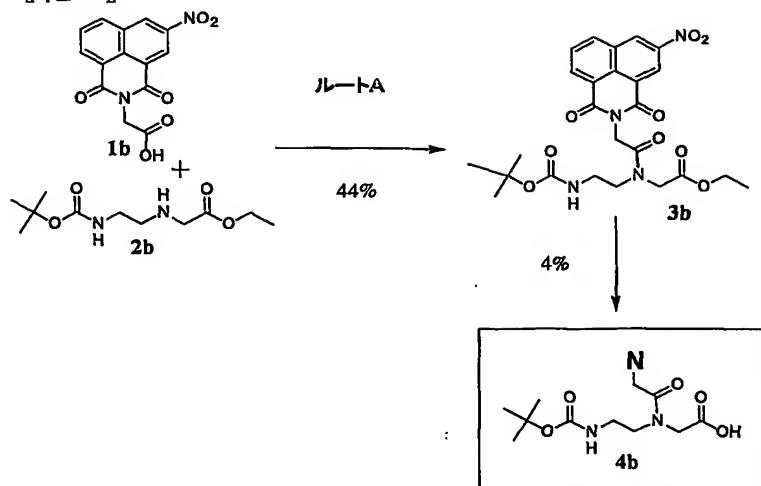
これ以外にも、光機能性オリゴ PNA のモノマーユニットの合成例は過去に 5 例が知られている。これら全てが上記ルートを用いているが、その収率については記載がないか、または極めて低いものでしかない (Peter E. Nielsen, Gerald Haaiman, Anne B. Eldrup PCT Int. Appl. (1998) WO 985295 A1 19981126, T. A. Tran, R.-H. Mattern, B. A. Morgan (1999) J. Pept. Res., 53, 134-145, Jesper Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem., 8, 503-509, Hans-georg Batz, Henrik Frydenlund Hansen, et al. Pct Int. Appl. (1998) WO 9837232 A2 19980827, Bruce Armitage, Troels Koch, et al. (1998) Nucleic Acid Res., 26, 715-720)。また、用いられる化合物の構造がアルカリ性条件に比較的安定であることが特徴的であるため、アルカリ性条件に不安定な発色団が付くと、前記従来法と類似の方法、すなわち下記ルート A

【化 7】



4

## 【化 8】

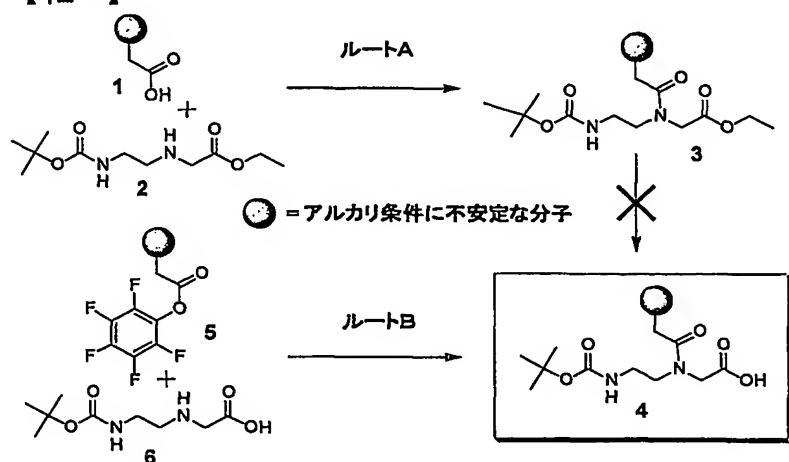


では効率良く合成できないと予想された。

したがって、一般に光機能性分子等の機能性分子は高価な場合が多いため、より合目的的な機能性 PNA の合成方法、すなわち、①機能性 PNA モノマー単位の設計における、機能性分子の PNA 背骨構造への効率的な導入、②コストパフォーマンスを考えた合成ルート、および③遺伝子診断薬としての応用へ適応させるための、これらの機能性分子を超高速に導入する方法が探求された。

上記課題に鑑み、本発明者らは、機能性 PNA モノマーの新規製造方法として、下記ルート B

## 【化 9】



に示すように、PNA 背骨構造に t-ブプトキシカルボニルアミノエチルアミ

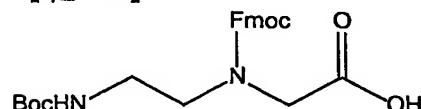
ン誘導体 6 を用いて 1 のペントフルオロフェニル基を含む活性エステル体 5 と縮合してほぼ定量的に光機能性 PNA モノマー 4 を合成する方法を見出した。

また、本発明者らは、機能性 PNA モノマーを合成する別法として、PNA 背骨構造に上記 t-ブトキシカルボニルアミノエチルアミン誘導体 6 の代わりにベンジルオキシカルボニルルーアミノ酸誘導体を用いる方法（ルート C）を見出した。これらの方法については、既に特許出願がなされている。

したがって、最終的に機能性 PNA を合成するための方法として、上記ルート B およびルート C のいずれかを用いる方法によって機能性 PNA モノマーを合成した後に、それらを重合する方法が工業的にも確立されつつある。すなわち、現在までの機能性 PNA の合成法によって PNA ブロープとして用いられる機能性 PNA を工業的に大量合成することは可能になりつつある。

一方、コストパフォーマンスの向上および機能性分子を超高速に導入することを目的とした、機能性 PNA を合成方法の改良もなされている。例えば、前記機能性 PNA モノマーユニットを用いる方法とは異なるアプローチとして、下記の前駆体的 PNA モノマーユニットを利用することによって、ポスト合成的に機能性分子を PNA オリゴマーに導入する方法が報告されている (Oliver Seitz; Tetrahedron Letters 1999, 40, 4161–4164.)。

#### 【化 10】

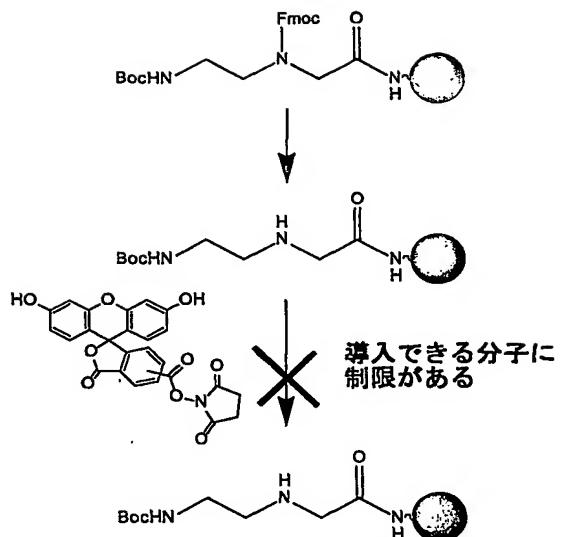


当該方法は、前記前駆体的 PNA モノマーユニットを PNA オリゴマーに導入した後、さらに機能性分子を導入することによって機能性 PNA を合成するものである。

しかし、当該方法においては、導入できる機能性分子の種類が限定される等の欠点がある。

例えば、下図に示すように、市販されている光機能性分子の succinimide エステルを導入することはできず、導入するためには Fmoc-Gly 等のリンカーをまず導入する必要があるが、結果として上記化合物は使用しにくいものになっている。

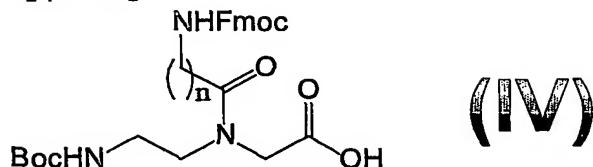
【化 11】



ところが、本発明者らは、前駆体的 PNA モノマーユニットの構造を最適化することによって、驚くべきことに、従来法における前記課題を克服し、コストパフォーマンスに優れ、かつ機能性分子を超高速に導入することができる、極めて広範にわたる機能性 PNA を合成できることを見出した。

すなわち、保護基によって保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有する PNA モノマーユニットを、下図に示す  $\text{Fmoc}-\omega-\text{アミノ酸}-\text{B}^{\circ}\text{PNA-OH}$  (IV) と反応させて PNA オリゴマーを合成した後、該 PNA オリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子をポスト合成的に導入することに成功した。

## 【化 12】



(式中、nは1~15までの整数を表す)

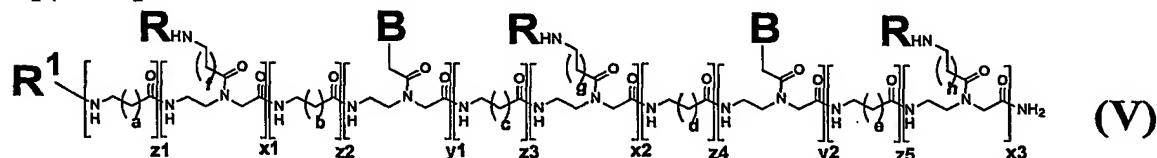
前記合成方法は、機能性分子を導入した後に、さらに別異の機能性分子の導入を行うことができる。また、導入される機能性分子が、光応答性機能分子、膜透過性機能分子、臓器選択性機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能分子、或いは分子認識性機能分子から選択されることを特徴とする。

また、導入する機能性分子として市販の succinimide エステルを使用する必要がなく、カルボン酸を有する化合物であれば問題なく利用でき且つ定量的に導入できるので、前記合成方法はコストパフォーマンスに極めて優れている。

さらに、前記前駆体的 PNA モノマーユニットを機能性 PNA オリゴマーに導入した後にレジンを分割することにより、それぞれのレジンに異なった機能性分子を導入することができるので、極めて高速な機能性 PNA オリゴマーの合成手法を開発することが可能となる。

この方法によって効率的な合成が可能になる機能性 PNA オリゴマーの例として、下記一般式 (V)

## 【化 13】



(式中、Bは、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、Rは、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc 基または機能性カルボン酸誘導体であり、R<sup>1</sup>は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、a~hは0~10の整数であり、X<sub>1</sub>~X<sub>3</sub>、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>およびZ<sub>1</sub>~Z<sub>5</sub>はいずれも0以上の整数であり、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>≥0であり、Y<sub>1</sub>+Y<sub>2</sub>>0であり、Z<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub>≥0である。ただし、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>およびZ<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub>が同時に0であることはなく、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>=0の場合、R<sup>1</sup>は機能性カルボン酸誘導体である。)で表される化合物において、Z<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub>=0であり、R<sup>1</sup>が水素原子である化合物を挙げることができる。

ところで、細胞中に導入するための蛍光プローブとして、これまで DNA

オリゴマー・RNA オリゴマー・PNA オリゴマーが利用されているが、これらを細胞中に導入するためには、当然ながら細胞膜を通過させなければならぬ。しかし、細胞膜は膜表面が負電荷を帯びているため、元々負に帶電している DNA/RNA オリゴマーを導入するのは非常に困難である。

一方 PNA オリゴマーは電気的に中性であるが、膜透過しにくいという結果が得られている。したがって、PNA オリゴマーを細胞内に導入するに際しては、膜表面を前処理してその導入をしやすくしたり、あるいはトランスフェクション試薬を用いて導入せざるを得ないのが現状である。

しかし、そのような処理を施して PNA オリゴマーを導入した場合においてプローブの機能が発揮されたとしても、本来生体が示す挙動を正確に表現していることは必ずしも保証されない。しかも、これは細胞 1 個の場合であり、多細胞（個体）での利用に至っては到底不可能である。

このような現状および観点から、膜透過性機能を有する蛍光 PNA プローブの開発が有用であると考えられている。

なお、膜透過性機能を有する蛍光 PNA プローブは既に存在する。例えば、①膜透過性機能を有するオリゴペプチドを PNA に結合させたもの、②膜透過性機能を有するリン脂質を PNA に結合させたものが挙げられる。しかしながら、これらは膜透過した後細胞内においてプロテアーゼ等の酵素により PNA 以外の部分が分解され、細胞内に滞留してしまうことが予想される。このことは、ターゲットを捕捉出来なかった過剰な PNA プローブが膜透過性機能を失い、その後の洗浄過程で細胞外に出にくくなることにつながるため、本来細胞が持っている遺伝子発現系を正確に表現できないことを意味する。

ところが、本発明者らは、Fmoc- $\omega$ -アミノ酸- $\text{B}^{\circ}\text{C}$ PNA-OH を含有した前駆体的 PNA オリゴマーを用いて、膜透過性機能を有するアミノ酸誘導体をポスト合成的に導入することにより、煩雑な前処理・後処理を含まない、すなわち生きた細胞をそのまま用いて遺伝子発現系を正確に分析できる新規蛍光 PNA プローブの設計に成功した。

しかし、この前駆体的 PNA オリゴマーは Fmoc- $\omega$ -アミノ酸- $\text{B}^{\circ}\text{C}$ PNA-OH のみが有効であるわけではなく、必須アミノ酸であるリジン誘導体でもその役割を代行することが可能で、扱いやすさ・入手のしやすさを考慮に入れた新規蛍光 PNA プローブの設計が今後必要になってくると予想される。

したがって、本発明は、コストパフォーマンスに優れ、かつ機能性分子を超高速に導入することができる、機能性 PNA の新規合成方法およびそれに用いる化合物、ならびに新規機能性 PNA を提供することを目的とする。

### 発明の開示

上記課題に鑑み研究を重ねた結果、本発明者らは、前駆体的 PNA モノマーエニットの構造を最適化することによって、驚くべきことに、従来法にお

ける前記課題が克服され、かつ極めて広範にわたる機能性 PNA を合成できることを見出し、以下のような本発明を完成するに至った。

(1). 機能性 PNA オリゴマーを製造する方法であって、保護基によつて保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有する PNA モノマーユニットを、一般式 (I) による *Boc*ー*リジン (Fmoc)*ーOH (尚、*Fmoc* とは 9-Fluorenylmethoxycarbonyl を示す。)、或いは下記の一般式 (I-I) による *Fmoc*ー*リジン (Alloc)*ーOH (尚、*Fmoc* とは 9-Fluorenylmethoxycarbonyl、*Boc* とは tButoxycarbonyl、*Alloc* とは Allyloxycarbonyl を示す。) と反応させて PNA オリゴマーを合成した後、該 PNA オリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子を導入し、さらに前記保護基の脱保護を行うことを含む、前記方法。

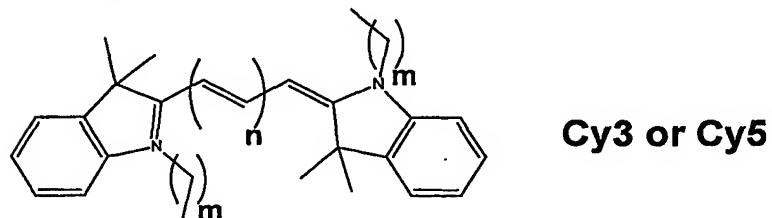
(2). 機能性 PNA オリゴマーを製造する方法は、機能性分子を導入した後に、さらに別異の機能性分子の導入を行うことを特徴とする前記 (1) の方法。

(3). 導入される機能性分子が、光応答性機能分子、膜透過性機能分子、臓器選択性機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能性分子、或いは分子認識性機能分子から選択されることを特徴とする前記 (1) の方法。

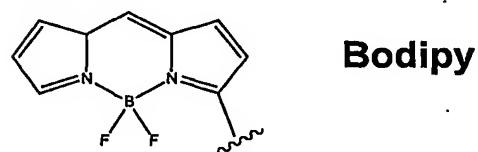
(4). 導入される機能性分子が、光機能性分子および膜透過性機能分子を含むことを特徴とする前記 (2)、(3) の方法。

(5). 光機能性分子が、下記の Cy3、Cy5、Bodipy、pyrene、naphthalimide、naphthaldiimide、FAM、FITC、ROX、TAMRA または Dabcyl であり、膜透過性機能分子が水溶性アミノ酸誘導体であることを特徴とする前記 (4) の方法。

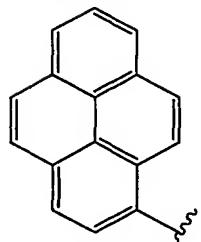
#### 【化 14】



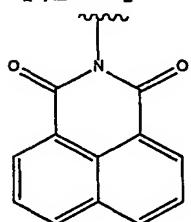
#### 【化 15】



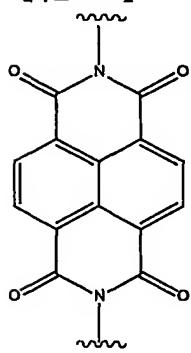
【化 16】

**Pyrene**

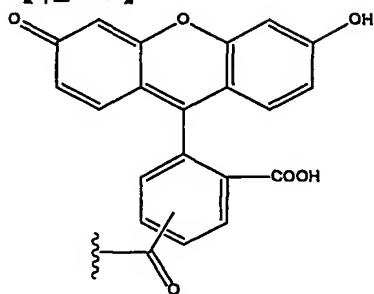
【化 17】

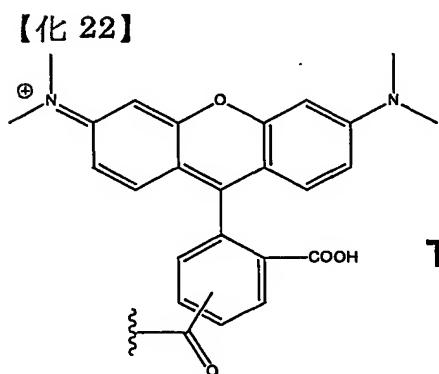
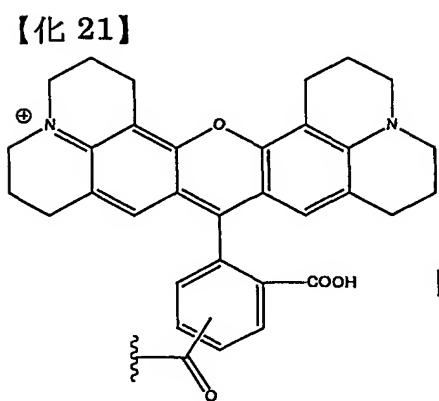
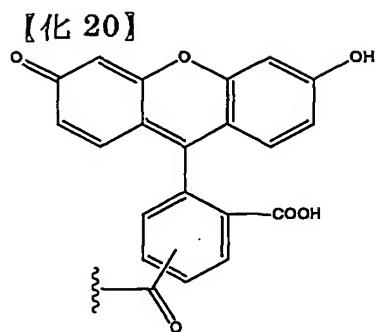
**Naphthalimide**

【化 18】

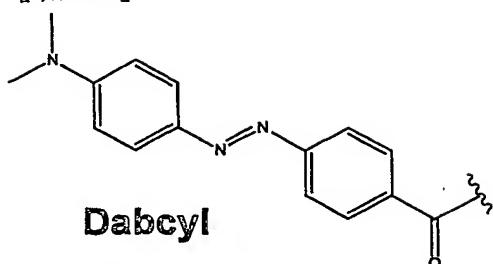
**Naphthaldiimide**

【化 19】

**FAM**



【化 23】



(6). アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを保護する保護基が、ベンジルオキシカルボニル基 (Z 基) であることを特徴とする前記 (1) ~ (5) のいずれかの方法。

(7). PNA オリゴマーの合成が、Boc 法用及び Fmoc 法用固相担体を用いた PNA 鎖における縮合・伸長を含むことを特徴とする前記 (1) ~ (6) のいずれかの方法。

(8). Boc 法用固相担体が固相 Boc 法でペプチド合成に使用する methylbenzhydrylamine 樹脂 (MBHA) であることを特徴とする、前記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の方法。

(9). Fmoc 法用固相担体が MBHA、ポリスチレンをクロロメチル化した樹脂(Merrifield 樹脂)、4-ヒドロキシベンジルアルコールで修飾した Merrifield 樹脂(Wang 樹脂)、Boc-アミノ酸-リンカーを結合させたアミノメチル樹脂(PAM 樹脂)、N-Fmoc-N-メトキシーリンカーを結合させたアミノメチル樹脂(Weinreb 樹脂)、ポリスチレンに p-ニトロベンゾフェノンオキシムを結合させた樹脂(Oxime 樹脂)、ポリスチレンを利用してトリチル化した樹脂(Trityl 樹脂) であることを特徴とする前記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の方法。

(10). 遊離カルボン酸を有する機能性分子の導入が、Boc 法における Fmoc 基をピペリジン処理によって或いは Fmoc 法における Alloc 基を亜鉛酢酸溶液処理によって、選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によって行われることを特徴とする前記 (1) ~ (9) のいずれかに記載の方法。

(11). 下記 a) ~d) :

a) Boc-リジン (Fmoc)-OH を PNA オリゴマー中に導入する工程において、PNA モノマーユニットを、Boc-リジン (Fmoc)-OH と反応させて PNA オリゴマーを製造すること；

b) 前記 PNA オリゴマーから機能性 PNA オリゴマーを製造する工程において、PNA オリゴマーへの機能性分子の導入が、Fmoc 基をピペリジン処理によって選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によつ

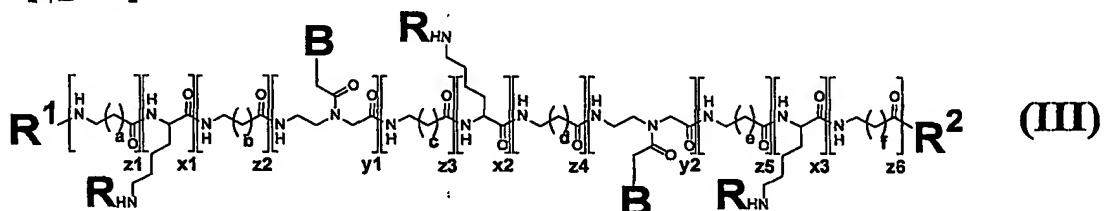
て行われること、の 1 または 2 以上を含むこと；

c) Fmoc-リジン (Alloc)-OH を PNA オリゴマー中に導入する工程において、PNA モノマーユニットを、Fmoc-リジン (Alloc)-OH と反応させて PNA オリゴマーを製造すること；および

d) 前記 PNA オリゴマーから機能性 PNA オリゴマーを製造する工程において、PNA オリゴマーへの機能性分子の導入が、Alloc 基を亜鉛酢酸溶液処理によって選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によつて行われること、の 1 または 2 以上を含むことを特徴とする前記 (2) 記載の方法。

(12). 下記一般式 (I I I)

【化 24】



(式中、B は、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、R は、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc 基または機能性カルボン酸誘導体であり、R<sup>1</sup> は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、R<sup>2</sup> は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、a~f は 0~∞ の整数であり、X<sub>1</sub>~X<sub>3</sub>、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub> および Z<sub>1</sub>~Z<sub>6</sub> はいずれも 0 以上の整数であり、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>≥0 であり、Y<sub>1</sub>+Y<sub>2</sub>>0 であり、Z<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub>≥0 である。ただし、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub> および Z<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub> が同時に 0 であることはなく、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>=0 の場合、R<sup>1</sup> は機能性カルボン酸誘導体である。) で表される化合物。

(13). X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>=3 であり、Y<sub>1</sub>+Y<sub>2</sub>=15 であることを特徴とする、前記 (12) 記載の化合物。

(14). X<sub>1</sub>=3 であり、Y<sub>1</sub>=15 であることを特徴とする、前記 (13) 記載の化合物。

(15). R または R<sup>1</sup> が細胞膜透過性機能分子誘導体であることを特徴とする、前記 (14) 記載の化合物。

(16). R<sup>1</sup> が機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、前記 (15) 記載の化合物。

(17). X<sub>1</sub>=Z<sub>1</sub>=1 であることを特徴とする、前記 (15) または (16) 記載の化合物。

(18). Y<sub>1</sub>≥2 であり、Z<sub>2</sub>=1 であることを特徴とする、前記 (15) ~ (17) のいずれかに記載の化合物。

(19).  $a \leq 6$  であり、 $b \leq 4$  であり、 $f \leq 6$  であることを特徴とする、前記(15)～(18)のいずれかに記載の化合物。

(20).  $R^1$  が光機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、前記(15)～(19)のいずれかに記載の化合物。

本発明は、Boc-リジン(Fmoc)-OH 或いは Fmoc-リジン(Alloc)-OH を PNA オリゴマーに導入した後、機能性分子をポスト合成的に導入することにより、ほぼ定量的に光機能性 PNA オリゴマーを合成できることに成功したものである。

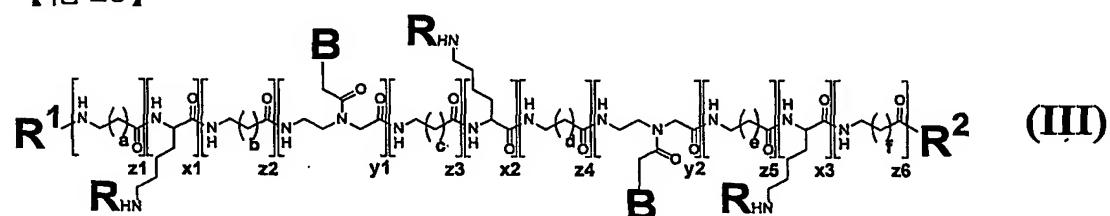
尚、Fmoc、Boc、Alloc の各趣旨については、証拠を説明する前記(1)において示した通りである。

上記特徴により、本発明の製造方法においては、導入する機能性分子として市販の succinimide エステルを使用する必要がなく、カルボン酸を有する化合物であれば問題なく利用でき且つ定量的に導入できる。そのため、本発明による製造方法はコストパフォーマンスに極めて優れている。

また、前記前駆体的 PNA モノマーユニットを機能性 PNA オリゴマーに導入した後にレジンを分割することにより、それぞれのレジンに異なった機能性分子を導入することができる。したがって、本発明による製造方法によれば、極めて高速な機能性 PNA オリゴマーの合成手法を開発することが可能となる。

本発明の方法によって効率的な合成が可能になる機能性 PNA オリゴマーの例として、下記一般式(III)

### 【化25】



(式中、B は、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、R は、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc 基または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^1$  は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、 $R^2$  は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、 $a \sim f$  は 0～∞の整数であり、 $X_1 \sim X_3$ 、 $Y_1$ 、 $Y_2$  および  $Z_1 \sim Z_6$  はいずれも 0 以上の整数であり、 $X_1 + X_2 + X_3 \geq 0$  であり、 $Y_1 + Y_2 > 0$  であり、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 \geq 0$  である。ただし、 $X_1 + X_2 + X_3$  および  $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5$  が同時に 0 であることはなく、 $X_1 + X_2 + X_3 = 0$  の場合、 $R^1$  は機能性カルボン酸誘導体である。) で表される化合物において、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 = 0$  であり、 $R^1$  が水素原子である化合物を挙げることができる。

本発明によれば、前記一般式（I）で表される化合物において同一または異なる機能性分子を、任意の複数の位置に導入することも可能となる。すなわち、前記前駆体的 PNA モノマーユニット s を用いて PNA オリゴマーを導入した後、ピペリジン処理或いは亜鉛酢酸溶液処理のいずれかと機能性分子のポスト合成的導入を一括して行うことによるものであるが、これは PNA オリゴマーの細胞膜透過機能を向上させるアンテナペディアを高速に設計する上で、欠かせないものである。この点においても、本発明による方法は極めて優れたものである。

このように製造される化合物の例として、前記一般式（I）において、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 > 0$  であり、R が細胞膜透過性分子誘導体であり、R<sup>1</sup> が機能性カルボン酸誘導体であるものが挙げられる。

このプローブは大きく蛍光標識領域・細胞膜透過性機能領域・分子認識領域の 3 つに分けることができ、それぞれをリンカー部位（Z<sub>1</sub>～Z<sub>5</sub> の添字付きで表される部分）を介して結合させた形をしている。

蛍光標識化合物は市販のものも、既に本発明者らが PCT 出願を行った新規蛍光標識化 PNA モノマーユニットも用いることができる。

分子認識部位は市販の PNA ユニットを用いて合成する。このものの特徴は、機能性分子をポスト合成的に導入するために前駆体ユニットとして Boc-リジン（Fmoc）-OH 或いは Fmoc-リジン（Alloc）-OH を膜透過性機能領域部に用いていることである。該前駆体ユニットは市販されており、これを複数個並べて導入した後、前記したように同一機能性分子を一括導入できることを特徴としている。

したがって、本発明によれば、光機能性分子に限定されることない、多種多様な機能性分子を、PNA 中に容易かつ極めて効率的に導入することができるようになる。

このような機能性分子として、Cy3 型、Cy5 型、Bodipy 型、Naphthalimide 型、Naphthalimidate 型、Flavin 型、Dabcyl 型、Biotin 型、FAM 型、Rhodamine 型、TAMRA 型、ROX 型、HABA 型、Pyrene 型、Coumarine 型等の光機能性モノマーユニット、膜透過性機能分子、臓器選択性機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能性分子、或いは分子認識性機能分子等が挙げられる。

すなわち、本発明における「機能性」の語は、光機能性のみならず、膜透過性、臓器選択性、殺菌性、分子破壊性、癒着性、或いは分子認識性等を含む、ある特定の修飾を行うことによって化合物に新たに付与される種々の機能の全てを意味するものである。

さらに、本発明における「機能性 PNA」の語は、PNA モノマー同士が 2-(N-アミノエチル) グリシン骨格によって直接結合したもののみならず、その間にリンカーとしての炭化水素鎖と機能性分子を導入する前駆体的なりジン骨格等を含むものも意味するものである。

## 図面の簡単な説明

図1は、DNAとPNAの構造および荷電の状況の違いを表す図である。

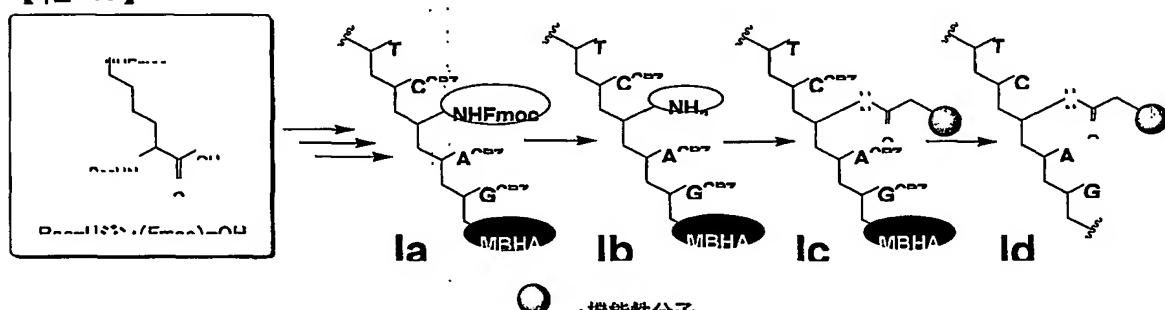
図2は、2種類のPNAモノマーユニットの構造を表す図である。

ここで、本発明による方法の特徴を更に詳細に説明する。

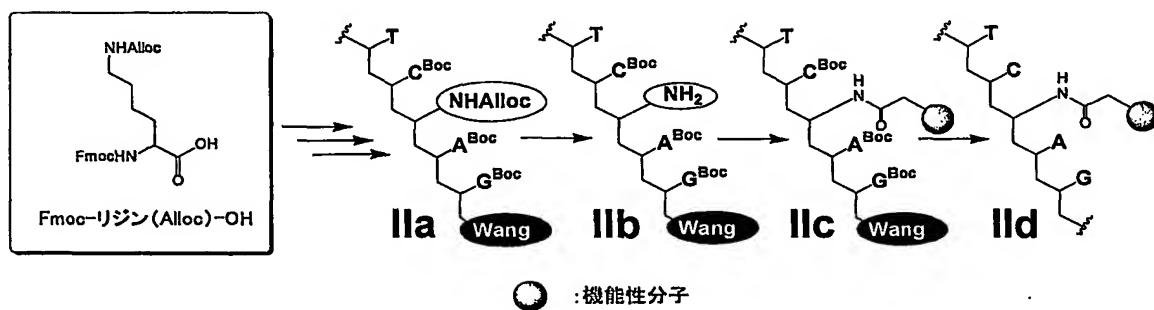
## 発明を実施するための最良の形態

本発明によるオリゴPNAを合成するルートは、典型的には、下図

【化26】



【化27】



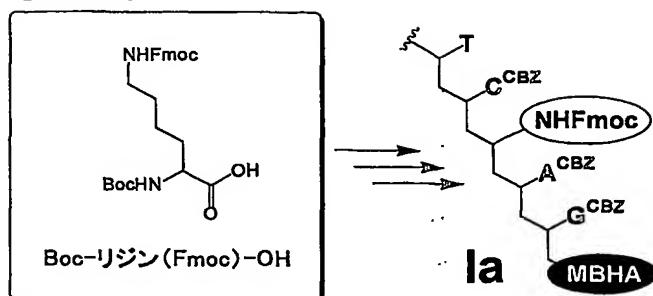
に示すとおりである。

尚、MBHAは、固相Bocでペプチド合成に使用するmethylbenzhydrylamine樹脂のことであり、Wangは、4-ヒドロキシベンジルアルコールで修飾したMerrifield樹脂のことであり、これらについては、【0036】、または【0037】において述べた通りである。

【0001】

次に、【化26】に関わる製造工程のうち、下図

## 【化 28】



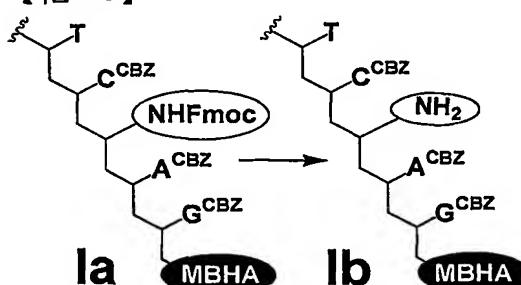
に示すように、Boc-リジン(Fmoc)-OHを用いて、オリゴマーIaを合成する。具体的には、Z基(N-ベンジルオキシカルボニル基)等で保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有するPNAモノマーユニットを、前駆体的PNAモノマーユニットと反応させ、Boc法用固相担体を用いてPNA鎖を逐次縮合・伸長せしめる。

PNA鎖の縮合においては、予めBoc基を脱離しておく必要があるが、その方法に制限はなく、一般的な方法が用いられる。それに続く縮合には、HATU、HBTUおよびBOP等の一般的な縮合剤が用いられる。

また、固相担体に関しては、Boc法用のものであれば特に制限はないが、特にMBHAが好適に用いられる。

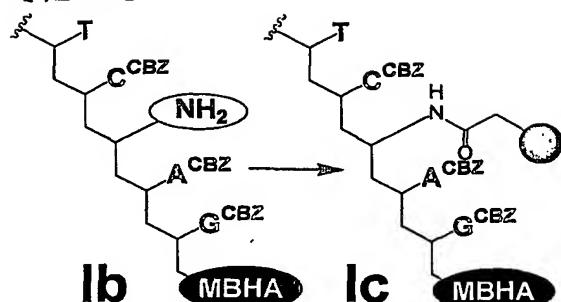
次に、【化26】に関わる製造工程のうち、下図

## 【化 29】



に示すように、ピペリジン処理によってFmoc基を選択的に脱保護してアミノ基とし、Ibを得て、さらに、下図

## 【化 30】



に示すように、該 **Ib** の前記アミノ基に遊離カルボン酸を有する機能性分子を脱水縮合して **Ic** を得る。

前記カルボン酸として特に制限はないが、反応性の点においては脂肪族カルボン酸が芳香族カルボン酸を上回るため、脂肪族カルボン酸を用いると製造の効率が高く好ましい。

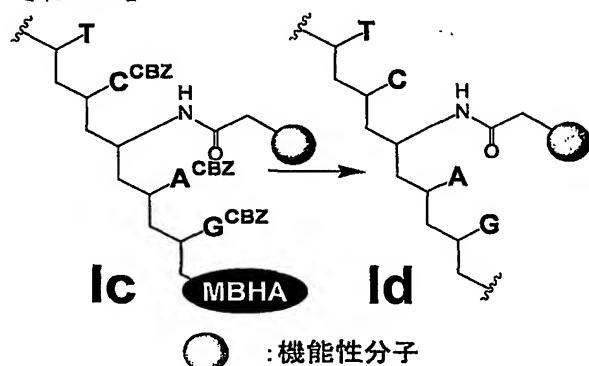
また、ピペリジン処理による Fmoc 基の脱保護は、ある程度の時間をかけることによって好適に行われる。特に、20~40 分が好適であり、最も好適には 30 分であった。

縮合剤の種類に特に制限はなく、前記 PNA 鎖の縮合と同様に、HATU、HBTU および BOP 等の一般的な縮合剤が用いられる。

なお、機能性分子の導入は、Boc-リジン (Fmoc) -OH を縮合した後、直ちに行ってもよく、あるいは、Boc-リジン (Fmoc) -OH を含む全ての PNA モノマーユニットを逐次縮合した後に行っててもよい。

最後に、【化 26】に関わる製造工程のうち、下図

## 【化 31】



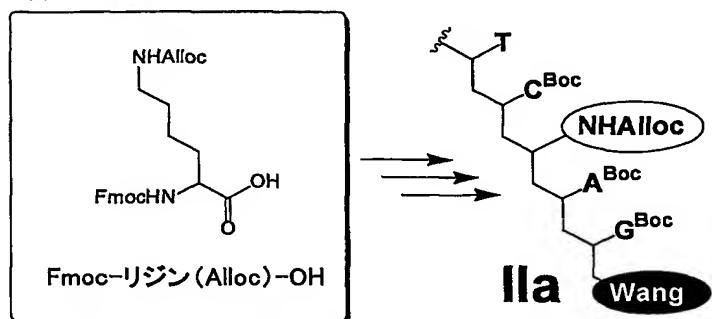
に示すように、担体レジンからの切り出しと Z 基の脱保護を同時に行うことによって、目的とする PNA オリゴマー **Id** を得る。

切り出しおよび脱保護は、Fmoc 基の脱保護の後に行われる限りにおいて

はその条件に特に制限はない。例えば、TFA／TFMSA／p-Cresol／Thioanisole=60／25／10／10 のような一般的な条件において好適に行われる。

次に、【化 27】に関わる製造工程のうち、下図

【化 32】



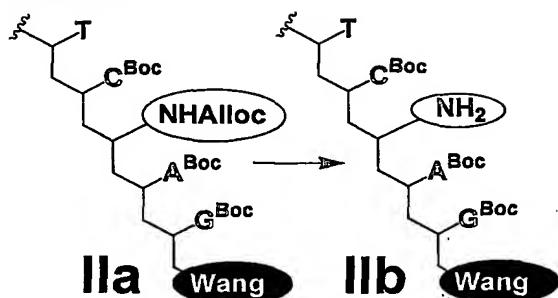
に示すように、Fmoc-リジン（Alloc）-OH を用いて、オリゴマー IIa を合成する。具体的には、Boc 基等で保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有する PNA モノマーユニットを、前駆体的 PNA モノマーユニットと反応させ、Fmoc 法用固相担体を用いて PNA 鎖を逐次縮合・伸長せしめる。

PNA 鎖の縮合においては、予め Fmoc 基を脱離しておく必要があるが、その方法に制限はなく、一般的な方法が用いられる。それに続く縮合には、HATU、HBTU および BOP 等の一般的な縮合剤が用いられる。

また、固相担体に関しては、Fmoc 法用のものであれば特に制限はないが、特に Wang が好適に用いられる。

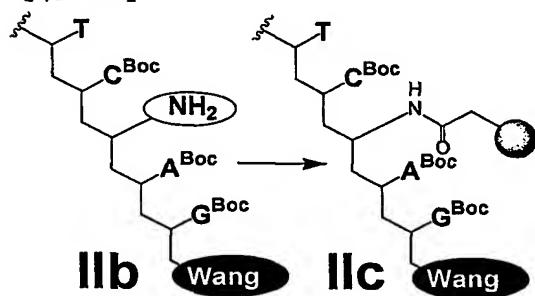
次に、【化 27】に関わる製造工程のうち、下図

## 【化 33】



に示すように、亜鉛酢酸溶液処理によって Fmoc 基を選択的に脱保護してアミノ基とし、IIb を得て、さらに、下図

## 【化 34】



に示すように、該 IIb の前記アミノ基に遊離カルボン酸を有する機能性分子を脱水縮合して IIc を得る。

前記カルボン酸として特に制限はないが、反応性の点においては脂肪族カルボン酸が芳香族カルボン酸を上回るため、脂肪族カルボン酸を用いると製造の効率が高く好ましい。

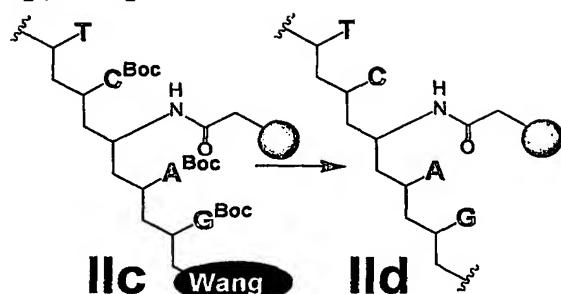
また、亜鉛酢酸溶液処理による Alloc 基の脱保護は、ある程度の時間をかけることによって好適に行われる。10 分～1 時間が好適であった。

縮合剤の種類に特に制限はなく、前記 PNA 鎖の縮合と同様に、HATU、HBTU および BOP 等の一般的な縮合剤が用いられる。

なお、機能性分子の導入は、Fmoc-リジン (Alloc)-OH を縮合した後、直ちに行ってもよく、あるいは、Fmoc-リジン (Alloc)-OH を含む全ての PNA モノマーユニットを逐次縮合した後に行ってもよい。

最後に、【化 27】に関わる製造工程のうち、下図

## 【化 35】



(○) :機能性分子

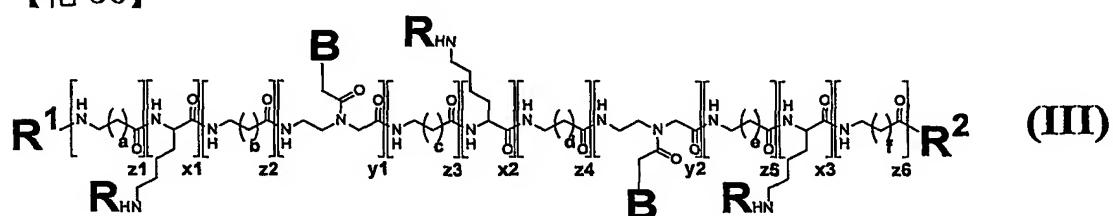
に示すように、担体レジンからの切り出しと Boc 基の脱保護を同時に行うことによって、目的とする PNA オリゴマー IIId を得る。

切り出しおよび脱保護は、Fmoc 基の脱保護の後に行われる限りにおいてはその条件に特に制限はない。例えば、TFA/p-Cresol=95/5 のような一般的な条件において好適に行われる。

上記のように、本発明による方法においては、従来の機能性モノマー合成に用いる活性エステル化の合成を要する方法とは異なり、機能性分子をそのまま利用できる。また一旦 IIa を合成した後に種々の機能性分子が導入可能であるため、従来困難であった高速かつ多様な並列 PNA プローブ合成が可能である。

Boc-リジン (Fmoc)-OH 或いは Fmoc-リジン (Alloc)-OH と PNA 鎖を有する分子との反応を含む本発明による方法によれば、下記一般式 (I I)

## 【化 36】

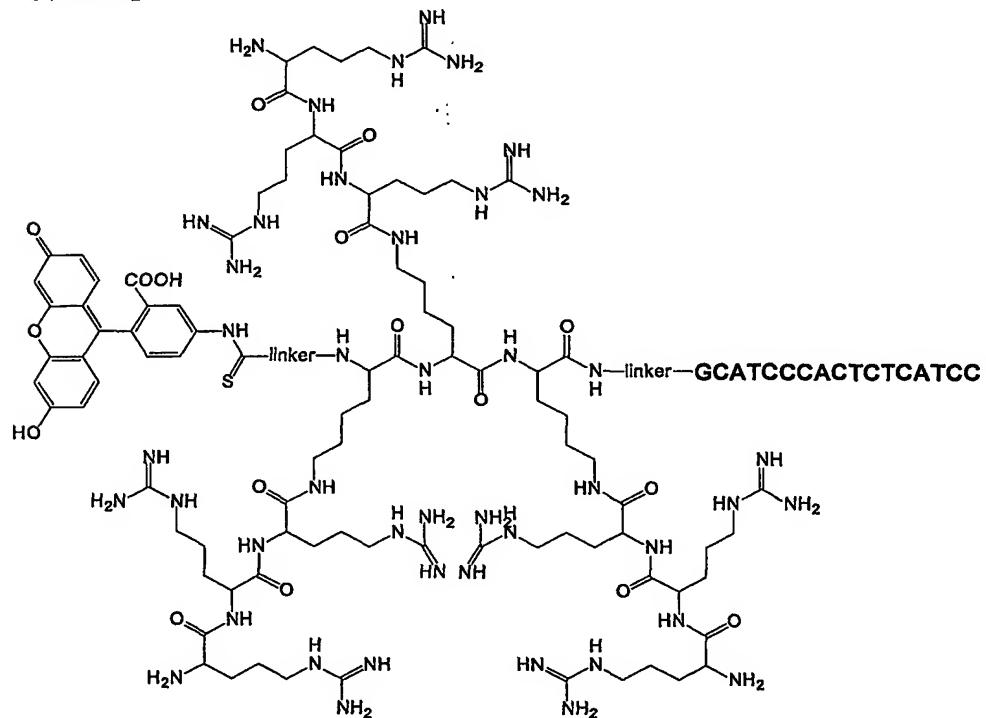


(式中、B は、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、R は、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc 基または機能性カルボン酸誘導体であり、R<sup>1</sup> は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、R<sup>2</sup> は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、a~f は 0~∞ の整数であり、X<sub>1</sub>~X<sub>3</sub>、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub> および Z<sub>1</sub>~Z<sub>6</sub> はいずれも 0 以上の整数であり、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>≥0 であり、Y<sub>1</sub>+Y<sub>2</sub>>0 であり、Z<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub>≥0

である。ただし、 $X_1 + X_2 + X_3$  および  $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5$  が同時に 0 であることはなく、 $X_1 + X_2 + X_3 = 0$  の場合、 $R^1$  は機能性カルボン酸誘導体である。) で表される化合物において、 $Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4 + Z_5 = 0$  であり、 $R^1$  が水素原子である化合物を挙げることができる。

また、前記一般式 (I I I) で表される化合物において、複数の機能性分子が導入されたものとして、例えば、 $R$  または  $R^1$  が細胞膜透過性機能分子誘導体であるものが好適に合成される。このような化合物は、典型的には、 $R$  が細胞膜透過性機能分子誘導体等であり、 $R^1$  が光機能性分子等の機能性カルボン酸誘導体等であるもの、すなわち、末端部を含む複数部位に機能性分子が導入され、それらによって複数の機能が付与された化合物である。このような化合物は、例えば下記のように模式化することができる。

### 【化 37】



このような化合物は、例えば前記一般式 (I I I) において、 $X_1 = Z_1 = Z_2 = 1$  であり、かつ  $Y_1 \geq 2$  である化合物である。このような化合物は合成のしやすさおよび合成コストの面等において好適である。

上記化合物において、 $a$ 、 $b$  および  $f$  はそれぞれ 0~10 の整数であれば特に限定されないが、例えば  $a \leq 6$  であり、 $b \leq 4$  であり、 $f \leq 6$  であるものであっても、合成上および実用上のいずれにおいても支障はない。

リンカー部位を導入することによって、個々の機能性部位および塩基配列

認識領域の干渉を防ぎ、分子の機能をより確実なものにすることができる。本明細書における PNA、PNA モノマーおよび PNA オリゴマーの語には、リンカ一部位をその末端および／または内部に含むものも包含される。

これらの部位または領域間の相互干渉を防そための部位としては、前記リンカ一部位のみならず、一般式 (I I I) における f～h を、所望に応じて選択することによっても可能である。

リンカ一部位を構成する基としては、直鎖状または分枝状の炭化水素およびそれらのエーテル体等が挙げられるが、直鎖状炭化水素基は導入の容易さおよびコストなどの面から好適であり、特に炭素数 1～6 の直鎖状炭化水素基が好適である。また、エーテル体は、その汎用性において好適である。

前記複数の機能性分子が導入された化合物は、例えば Koch, T.; Hansen, H.F.; Andersen, P.; Larsen, T.; Batz, H.G.; Otteson, K.; Ørum, H. *J. Peptide Res.* 1997, 49, 80-88. を利用して好適に合成される。

塩基配列認識部位は、市販の各種 PNA モノマーを用いて固相合成によりオリゴマー化することができる。リンカ一部位には、市販の Boc-7-アミノヘプタン酸、Boc-6-アミノカプロン酸等を用いることができる。

一般式 (I I I) の機能性分子として光機能性分子を導入すれば、蛍光標識することが可能であり、かつ他の機能も有する化合物を合成することができる。このような蛍光標識部位として、市販の Cy3、Cy5、Bodipy、pyrene、naphthalimide、naphthaldimide、FAM、FITC、ROX、TAMRA または Dabcyl 等の市販の活性エステル型蛍光標識化合物を用いて、多様な蛍光発光波長を選択することができるが、導入される蛍光標識化合物はこれらに限定されるものではない。

本発明の化合物に導入し得る他の機能性の例としては、膜透過性機能が挙げられる。このような膜透過性機能部位は、前回特許前記一般式 (I I I) で表される化合物を用いることにより、同様に導入することができる。膜透過性を向上させることができる機能性分子としてアルギニンが挙げられるが、リシンおよびセリン等の他の水溶性アミノ酸も好適に用いることができる。

また、Boc-リジン (Fmoc)-OH 或いは Fmoc-リジン (Alloc)-OH を利用することによって、複数個のアミノ酸を導入することも可能である。その合成例は実施例 1 に示した。しかしながら、上記化合物は本発明による膜透過性機能を有する蛍光 PNA プローブのモデル化合物であり、本発明はこれらに限定されるものではない。

これらのプローブの特徴は、「全て PNA 型になっているので、完全な酵素耐性を有すること」である。すなわち、これまでの膜透過性機能を有するプローブは、PNA と膜透過性機能を有するペプチド鎖あるいはリン脂質を共有結合させたものが主流であったが、これらの既知のプローブは優れた膜透過性機能を有するものの、一旦細胞内に入ると酵素群によりペプチド鎖あるいはリン脂質が分解されることが予想される。したがって、これらは、タ

ターゲットを認識していない分解を受けたプローブを洗浄過程で完全に取り除くことができないという欠点を有する。

これに対して、今回設計したプローブは、細胞内においても酵素分解を受けないため、ターゲットを認識していないプローブは洗浄過程で完全に取り除かれるため、正確な遺伝子発現量の定量を可能とするものである。

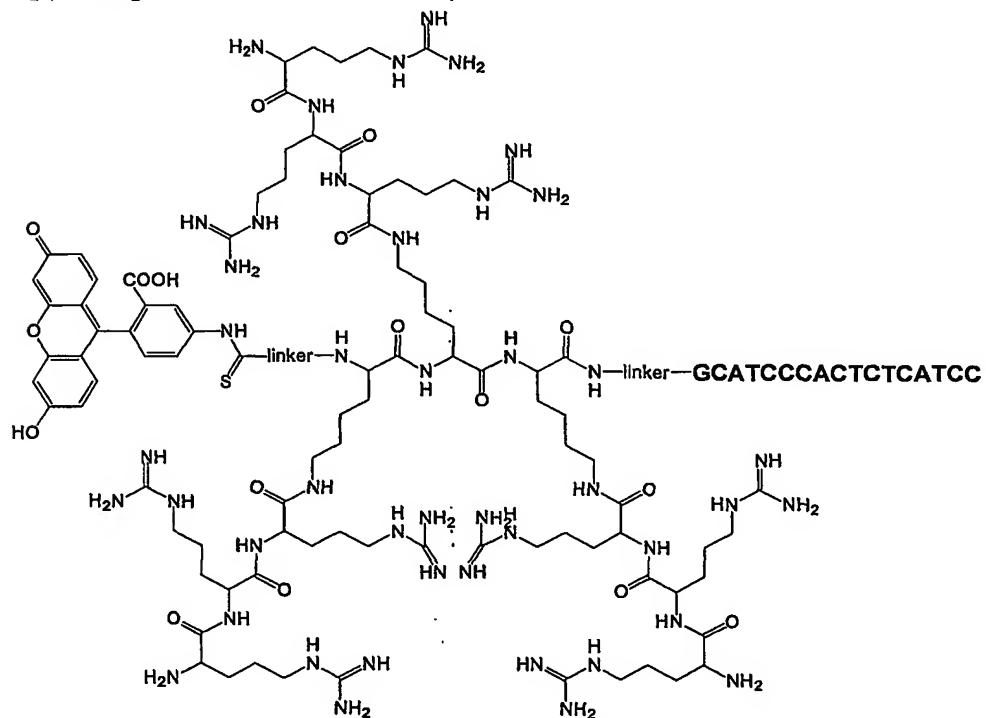
なお、これらの機能性を有する化合物以外にも、ラクトースやトリスエックス等の臓器選択機能性分子、タナチンやセクロピン等の殺菌機能性分子およびビオローゲン等の分子認識機能性分子、N-メチルヒドロキサム酸等の分子破壊性機能分子等も本発明によれば制限なく導入することが可能であり、そのような化合物を、大量に低コストで実用に供することが可能になる。

#### 実施例

以下に実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれに限られるものではない。

#### (実施例 1) 膜透過性機能を有する蛍光 PNA プローブの合成

##### 【化 38】



標準的 Boc 法 (cf. Koch, T.; Hansen, H.F.; Andersen, P.; Larsen, T.; Batz, H.G.; Otteson, K.; Ørum, H. *J. Peptide Res.* 1997, 49, 80-88.) に従い、まず、固相担体 MBHA (50 mg) にチミン PNA モノマーユニット (7.7 mg、

20 mmol)、縮合剤 HBTU (7.6 mg、20 mmol) と DIEA (3.5 mL、20 mL) を用いて逐次伸長反応を行った (塩基配列認識領域の設計)。

次いで、リンカー用  $\omega$ -アミノ酸-Boc-7-aminoheptanoic Acid (5.2 mg、20 mmol)、Fmoc-Ahx-<sup>Boc</sup>PNA-OH (10.0 mg、20 mmol) と再度 Boc-7-aminoheptanoic Acid を、縮合剤 HBTU (7.6 mg、20 mmol) と DIEA (3.5 mg、20 mmol) を用いて順次縮合させた (リンカー部位と膜透過性機能領域の設計)。

全てのユニットを逐次縮合した後、ピペリジン処理 (20% piperidine in DMF、室温 3 分) して Fmoc 基を脱保護した。次いで、機能性カルボン酸誘導体として天然型 Fmoc-Arg(Mts)-OH (23.1 mg、40 mmol) を縮合剤 HBTU (15.2 mg、40 mmol) と DIEA (7.0 mL、40 mmol) を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した (膜透過性機能の導入)。

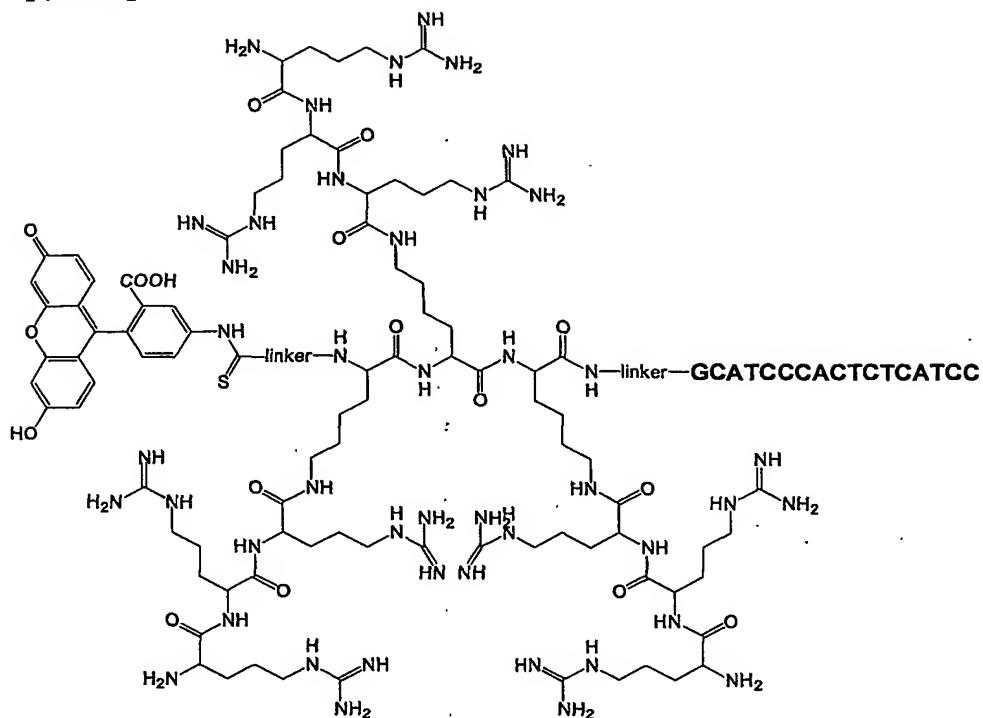
これをピペリジン処理 (20% piperidine in DMF、室温 3 分) して Fmoc 基を脱保護した後、再度天然型 Fmoc-Arg(Mts)-OH (23.1 mg、40 mmol) を縮合剤 HBTU (15.2 mg、40 mmol) と DIEA (7.0 mL、40 mmol) を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した。これをもう一度繰り返した (膜透過性機能の追加導入)。

TFA 処理 (95% TFA/5% m-cresol) により Boc 基を脱保護した後、FITC (9.3 mg、25 mg) を DIEA (17.4 mg、100 mmol) 存在下、室温で 12 時間攪拌し蛍光標識化した (蛍光標識部位の設計)。

最後にピペリジン処理 (2 哨 piperidinein D 肝、室温 3 分) して残る Fmoc 基を脱保護した後、常法 (TFA/TFMSA/p-cresol/thioanisole=60/25/10/10) により固相担体からの切り出しを行い、後処理して、目的物を得た。MALDI-TOF MS : calcd. 6373.0231 ( $M+H^+$ ) .

#### (実施例 2) 膜透過性機能を有する蛍光 PNA プローブの合成

## 【化 39】



標準的 Boc 法 (cf. Koch, T.; Hansen, H.F.; Andersen, P.; Larsen, T.; Batz, H.G.; Otteson, K.; Ørum, H. *J. Peptide Res.* 1997, 49, 80-88.) に従い、まず、固相担体 MBHA (50 mg) にチミン PNA モノマーユニット (7.7 mg、20 mmol)、縮合剤 HBTU (7.6 mg、20 mmol) と DIEA (3.5 mL、20 mL) を用いて逐次伸長反応を行った (塩基配列認識領域の設計)。

次いで、リンカー用  $\omega$ -アミノ酸-Boc-7-aminoheptanoic Acid (5.2 mg、20 mmol)、Fmoc-Ahx-<sup>Boc</sup>PNA-OH (10.0 mg、20 mmol) と再度 Boc-7-aminoheptanoic Acid を、縮合剤 HBTU (7.6 mg、20 mmol) と DIEA (3.5 mg、20 mmol) を用いて順次縮合させた (リンカー部位と膜透過性機能領域の設計)。

全てのユニットを逐次縮合した後、ピペリジン処理 (20% piperidine in DMF、室温 3 分) して Fmoc 基を脱保護した。次いで、機能性カルボン酸誘導体として非天然型 Fmoc-Arg(Mts)-OH (23.1 mg、40 mmol) を縮合剤 HBTU (15.2 mg、40 mmol) と DIEA (7.0 mL、40 mmol) を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した (膜透過性機能の導入)。

これをピペリジン処理 (20% piperidine in DMF、室温 3 分) して Fmoc 基を脱保護した後、再度非天然型 Fmoc-Arg(Mts)-OH (23.1 mg、40 mmol) を縮合剤 HBTU (15.2 mg、40 mmol) と DIEA (7.0 mL、40 mmol)

を用いて縮合し目的の位置に機能性分子を導入した。これをもう一度繰り返した（膜透過性機能の追加導入）。

TFA 处理 (95% TFA/5% m-cresol) により Boc 基を脱保護した後、 FITC (9.3 mg、25 mg) を DIEA (17.4 mg、100 mmol) 存在下、室温で 12 時間攪拌し蛍光標識化した（蛍光標識部位の設計）。

最後にピペリジン処理 (2 品 pipericidinein D 肝、室温 3 分) して残る Fmoc 基を脱保護した後、常法 (TFA/TFMSA/p-cresol/thioanisole=60/25/10/10) により固相担体からの切り出しを行い、後処理して、目的物を得た。 MALDI-TOF MS : calcd. 6373.0231 ( $M+H^+$ ) .

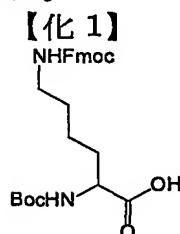
#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、光機能性分子に限定されることない多種多様な機能性分子を、PNA 中に容易かつ効率的に導入することができ、遺伝子治療などに用いられる種々の PNA の構築が可能になるので、本発明は、広範な医療産業分野において利用することができる。

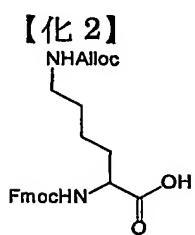
## 請求の範囲

### A 請求の範囲

1. 機能性 PNA オリゴマーを製造する方法であつて、保護基によって保護されたアデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを有する PNA モノマーユニットを、一般式 (I) による Boc-リジン (Fmoc)-OH (尚、Fmoc とは 9-Fluorenylmethoxycarbonyl を示す。)、或いは下記の一般式 (II) による Fmoc-リジン (Alloc)-OH (尚、Fmoc とは 9-Fluorenylmethoxycarbonyl、Boc とは tButoxycarbonyl、Alloc とは Allyloxycarbonyl を示す。) と反応させて PNA オリゴマーを合成した後、該 PNA オリゴマーに遊離カルボン酸を有する機能性分子を導入し、さらに前記保護基の脱保護を行うことを含む、前記方法。



Boc-リジン (Fmoc)-OH (I)



Fmoc-リジン (Alloc)-OH (II)

2. 機能性分子を導入した後に、さらに別異の機能性分子の導入を行うことを特徴とする、請求の範囲 1 に記載の方法。
3. 導入される機能性分子が、光応答性機能分子、膜透過性機能分子、臓器選択性機能分子、殺菌性機能分子、分子破壊性機能分子、癒着性機能性分子、或いは分子認識性機能分子から選択されることを特徴とする、請求の範囲 1~2 のいずれかに記載の方法。
4. 導入される機能性分子が、光機能性分子および膜透過性機能分子を含むことを特徴とする、請求の範囲 2 または 3 に記載の方法。
5. 光機能性分子が、Cy3、Cy5、Bodipy、pyrene、naphthalimide、naphthaldiimide、FAM、FITC、ROX、TAMRA または Dabcyl であり、膜透過性機能分子が水溶性アミノ酸誘導体であることを特徴とする、請求の範囲 4 に記載の方法。

6. アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンを保護する保護基が、ベンジルオキシカルボニル基 (Z 基) であることを特徴とする、請求の範囲 1~5 のいずれかに記載の方法。

7. PNA オリゴマーの合成が、Boc 法用及び Fmoc 法用固相担体を用いた PNA 鎖における縮合・伸長を含むことを特徴とする、請求の範囲 1~6 のいずれかに記載の方法。

8. Boc 法用固相担体が固相 Boc 法でペプチド合成に使用する methylbenzhydrylamine (MBHA) であることを特徴とする、請求の範囲 1~7 のいずれかに記載の方法。

9. Fmoc 法用固相担体が MBHA、ポリスチレンをクロロメチル化した樹脂 (Merrifield 樹脂)、4-ヒドロキシベンジルアルコールで修飾した Merrifield 樹脂 (Wang 樹脂)、Boc-アミノ酸-リンカーを結合させたアミノメチル樹脂 (PAM 樹脂)、N-Fmoc-N-メトキシーリンカーを結合させたアミノメチル樹脂 (Weinreb 樹脂)、ポリスチレンに p-ニトロベンゾフェノンオキシムを結合させた樹脂 (Oxime 樹脂)、ポリスチレンを利用してトリチル化した樹脂 (Trityl 樹脂) であることを特徴とする請求の範囲 1~7 のいずれかに記載の方法。

10. 遊離カルボン酸を有する機能性分子の導入が、Boc 法における Fmoc 基をピペリジン処理によって或いは Fmoc 法における Alloc 基を亜鉛酢酸溶液処理によって、選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によって行われることを特徴とする、請求の範囲 1~9 のいずれかに記載の方法。

11. 下記 a) ~d) :

a) Boc-リジン (Fmoc)-OH を PNA オリゴマー中に導入する工程において、PNA モノマーユニットを、Boc-リジン (Fmoc)-OH と反応させて PNA オリゴマーを製造すること；

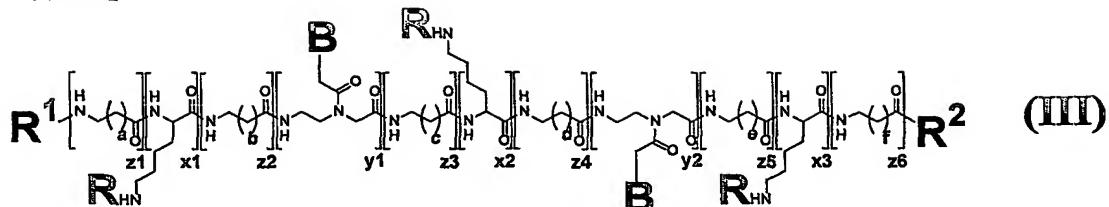
b) 前記 PNA オリゴマーから機能性 PNA オリゴマーを製造する工程において、PNA オリゴマーへの機能性分子の導入が、Fmoc 基をピペリジン処理によって選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によって行われること、の 1 または 2 以上を含むことを特徴とする、請求の範囲 2 に記載の方法；

c) Fmoc-リジン (Alloc)-OH を PNA オリゴマー中に導入する工程において、PNA モノマーユニットを、Fmoc-リジン (Alloc)-OH と反応させて PNA オリゴマーを製造すること；および

d) 前記 PNA オリゴマーから機能性 PNA オリゴマーを製造する工程において、PNA オリゴマーへの機能性分子の導入が、Alloc 基を亜鉛酢酸溶液処理によって選択的に脱保護して得られた 1 級アミノ基との脱水縮合によって行われること、の 1 または 2 以上を含むことを特徴とする、請求の範囲 2 に記載の方法。

12. 下記の一般式 (I I I)

## 【化 3】



(式中、Bは、互いに独立し、同一または異なって、アデニン、グアニン、シトシンまたはチミンであり、Rは、互いに独立し、同一または異なって、Fmoc基または機能性カルボン酸誘導体であり、R<sup>1</sup>は、水素原子または機能性カルボン酸誘導体であり、R<sup>2</sup>は、水素原子、アミノ基、水酸基、チオール基を含む誘導体または機能性カルボン酸誘導体であり、a～fは0～∞の整数であり、X<sub>1</sub>～X<sub>3</sub>、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>およびZ<sub>1</sub>～Z<sub>6</sub>はいずれも0以上の整数であり、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>≥0であり、Y<sub>1</sub>+Y<sub>2</sub>>0であり、Z<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub>≥0である。ただし、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>およびZ<sub>1</sub>+Z<sub>2</sub>+Z<sub>3</sub>+Z<sub>4</sub>+Z<sub>5</sub>が同時に0であることはなく、X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>=0の場合、R<sup>1</sup>は機能性カルボン酸誘導体である。)で表される化合物。

13. X<sub>1</sub>+X<sub>2</sub>+X<sub>3</sub>=3であり、Y<sub>1</sub>+Y<sub>2</sub>=15であることを特徴とする、請求項12に記載の化合物。

14. X<sub>1</sub>=3であり、Y<sub>1</sub>=15であることを特徴とする、請求の範囲13に記載の化合物。

15. 1 RまたはR<sup>1</sup>が細胞膜透過性機能分子誘導体であることを特徴とする、請求項14に記載の化合物

16. R<sup>1</sup>が機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、請求の範囲15に記載の化合物。

17. X<sub>1</sub>=Z<sub>1</sub>=1であることを特徴とする、請求の範囲15または16に記載の化合物。

18. Y<sub>1</sub>≥2であり、Z<sub>2</sub>=1であることを特徴とする、請求の範囲15～17のいずれかに記載の化合物。

19. a≤6であり、b≤4であり、f≤6であることを特徴とする、請求の範囲15～18のいずれかに記載の化合物。

20. R<sup>1</sup>が光機能性カルボン酸誘導体であることを特徴とする、請求の範囲15～19のいずれかに記載の化合物。

1 / 1

図 1

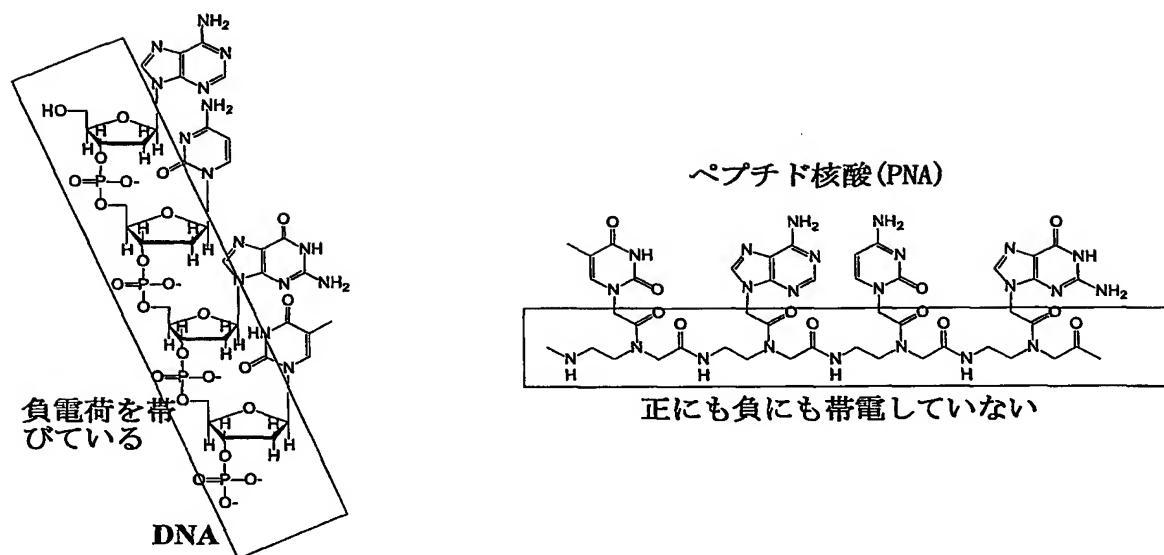
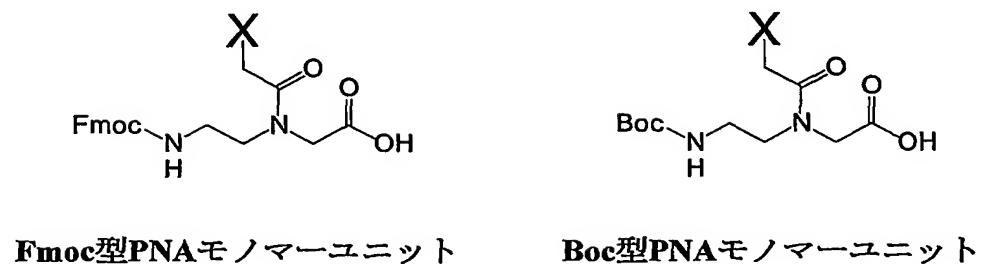


図 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005392

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/10, C07K2/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/10, C07K2/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLus (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), PUBMED, JSTPlus (STN)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P, A      | MOKHIR A. et al., Synthesis and DNA Binding Properties of Terminally Modified Peptide Nucleic Acids, Bioorg.Med.Chem.Lett. (2003-Aug-04), Vol.13, No.15, pages 2489 to 2492 | 1-20                  |
| A.        | MOKHIR A. et al., Synthesis and monitored selection of 5'-nucleobase-capped oligo-deoxyribonucleotides, Nucleic Acids Res. (2000), Vol.28, No.21, pages 4254 to 4265        | 1-20                  |
| A         | FLUOZAT C. et al., Solid-phase synthesis of "head-to-side chain" cyclic tripeptides using allyl deprotection, Tetrahedron Lett. (1997), Vol.38, No.7, pages 1191 to 1194    | 1-20                  |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

|  |  |
|--|--|
| * Special categories of cited documents: |  |
| "A"                                      | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance   |
| "E"                                      | earlier application or patent but published on or after the international filing date  |
| "L"                                      | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  |
| "O"                                      | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means   |
| "P"                                      | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed   |
| "T"                                      | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "X"                                      | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "Y"                                      | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "&"                                      | document member of the same patent family  |

Date of the actual completion of the international search  
21 May, 2004 (21.05.04)Date of mailing of the international search report  
08 June, 2004 (08.06.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005392

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | VALENTIJN A.R.P.M. et al., Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the asialoglycoprotein Receptor, Tetrahedron (1997), Vol.53, No.2, pages 759 to 770 | 1-20                  |
| A         | KATES S. et al., Automated Allyl Cleavage for Continuous-Flow Synthesis of Cyclic and Branched Peptides, Anal.Biochem.(1993), Vol.212, No.2, pages 303 to 310                                    | 1-20                  |

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' C12N15/10, C07K2/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' C12N15/10, C07K2/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAP Ius (STN), REGISTRY(STN), WPI(DIALOG), PUBMED,  
JSTPLus (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| P, A            | MOKHIR A. et al., Synthesis and DNA Binding Properties of Terminally Modified Peptide Nucleic Acids, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2003-Aug-04), Vol. 13, No. 15, p. 2489-2492 | 1-20             |
| A               | MOKHIR A. et al., Synthesis and monitored selection of 5'-nucleobase-capped oligodeoxyribonucleotides, Nucleic Acids Res. (2000), Vol. 28, No. 21, p. 4254-4265            | 1-20             |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 05. 2004

国際調査報告の発送日

08. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

上條 肇

4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A               | FLUOZAT C. <i>et al.</i> , Solid-phase synthesis of "head-to-side chain" cyclic tripeptides using allyl deprotection, Tetrahedron Lett. (1997), Vol. 38, No. 7, p. 1191-1194                            | 1-20             |
| A               | VALENTIJN A. R. P. M. <i>et al.</i> , Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the asialoglycoprotein Receptor, Tetrahedron (1997), Vol. 53, No. 2, p. 759-770 | 1-20             |
| A               | KATES S. <i>et al.</i> , Automated Allyl Cleavage for Continuous-Flow Synthesis of Cyclic and Branched Peptides, Anal. Biochem. (1993), Vol. 212, No. 2, p. 303-310                                     | 1-20             |